

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-343385

(43)Date of publication of application : 14.12.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
G01N 33/543
G01N 33/566
G01N 35/02
G01N 37/00

(21)Application number : 2000-204355

(71)Applicant : SHIBAHARA TERUHISA

(22)Date of filing : 02.06.2000

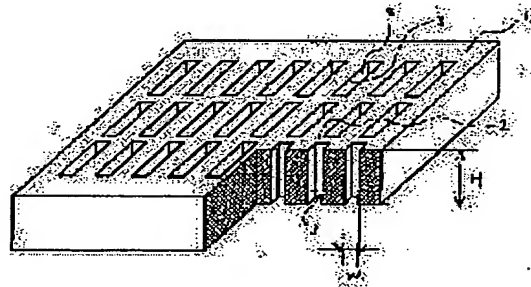
(72)Inventor : SHIBAHARA TERUHISA

(54) SOLID-PHASE BASE MATERIAL FOR PROBE ARRAY, AND PROBE ARRAY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a probe array having both a high probe integration density and a high detection sensitivity.

SOLUTION: This solid-phase base material formed by arranging flutes 2 in a plate 1 is used to hold probes on the walls 3 of the flutes 2.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-343385
(P2001-343385A)

(43) 公開日 平成13年12月14日 (2001. 12. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターム(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 5 8
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/543	5 0 1 A 4 B 0 2 9
G 0 1 N 33/543	5 0 1	33/566	
33/566		35/02	F

審査請求 未請求 請求項の数14 書面 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-204355(P2000-204355)

(22) 出願日 平成12年6月2日(2000. 6. 2)

(71) 出願人 500316593

柴原 輝久

千葉県習志野市藤崎5丁目9番23号

(72) 発明者 柴原 輝久

神奈川県相模原市瀬野辺2丁目27番8号

村田製作所瀬野辺社宅501号室

Fターム(参考) 2G058 AA09 CC02 CC08 EA11 GA02

4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 HA14

HA19

4B029 AA07 AA21 BB15 BB17 BB20

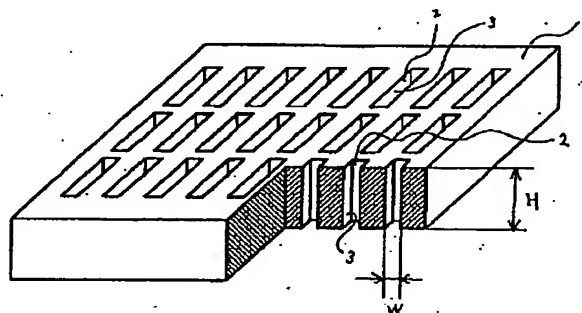
CC03 CC08 FA15

(54) 【発明の名称】 ブローブアレイ用固相基材、およびブローブアレイ

(57) 【要約】

【課題】 高いブローブ集積密度と高い検出感度とを両立するブローブアレイを提供する。

【解決手段】 プレート1に縦溝2を配列した固相基材を用いて、縦溝2の壁面3にブローブを保持する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレートに備えたブローブアレイ用固相基材において、該プレートに縦溝が配列して、かつ該縦溝が該プレートの表面に対してほぼ垂直な壁面を有して、かつ該縦溝の幅が100マイクロメートル以下であって、かつ該縦溝の深さが該縦溝の幅の2倍以上であることを特徴とするブローブアレイ用固相基材。

【請求項2】 該縦溝が該プレートに設けられた掘りこみである請求項1記載のブローブアレイ用固相基材。

【請求項3】 該縦溝が該プレートを貫通している請求項2記載のブローブアレイ用固相基材。

【請求項4】 該プレートが単結晶シリコンである請求項2または3記載のブローブアレイ用固相基材。

【請求項5】 該プレートの上に形成された構造物の壁面によって該縦溝が形成されている請求項1記載のブローブアレイ用固相基材。

【請求項6】 該縦溝が、該プレートの表面とほぼ平行な開口面以外にも開口面を有する請求項1～5のいずれか一項記載のブローブアレイ用固相基材。

【請求項7】 該縦溝が1平方センチメートルあたり100個以上の密度で該プレートに形成されている請求項1～6のいずれか一項記載のブローブアレイ用固相基材。

【請求項8】 標的とする生体高分子に対して特異的に結合可能であるブローブを固相基材の上に複数種類並べて保持したブローブアレイにおいて、該固相基材として請求項1～7のいずれか一項記載のブローブアレイ用固相基材を用いて、該縦溝の壁面に該ブローブを保持したことを特徴とするブローブアレイ。

【請求項9】 該ブローブが一本鎖核酸である請求項8記載のブローブアレイ。

【請求項10】 該ブローブが一本鎖DNAである請求項9記載のブローブアレイ。

【請求項11】 該ブローブがオリゴペプチドあるいはポリペプチドである請求項8記載のブローブアレイ。

【請求項12】 該ブローブが蛋白質である請求項8記載のブローブアレイ。

【請求項13】 該ブローブが抗体である請求項12記載のブローブアレイ。

【請求項14】 該ブローブが抗原である請求項8記載のブローブアレイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はブローブアレイ用固相基材、および固相基材に複数種類のブローブ（標的とする生体高分子に対して特異的に結合し得る物質）を各々独立に並べて保持したブローブアレイに関する。

【0002】

【従来の技術】サンプル中の生体高分子を検出する方法の一つとして、固相基材に複数種類のブローブ（標的と

する生体高分子に対して特異的に結合し得る物質）を各々独立に並べて保持したブローブアレイを使用する方法がある。図5にブローブアレイの例を示す。図5の例においては、固相基材80に、ブローブ81が並べて保持されている。

【0003】ブローブアレイを用いる利点は、一度の検出試験で、複数種類の生体高分子の検出を行なえるという点である。たとえば、複数種類の抗原をブローブとして並べたブローブアレイを使用すれば、一度の検出試験で、その複数種類の抗原それぞれに対する抗体の有無を調べることができる。また例えば、複数種類の遺伝子変異について、それぞれの遺伝子変異をコードする核酸に対するブローブを並べたブローブアレイを使用すれば、一度の検出試験で、その複数種類の遺伝子変異それぞれの有無を調べることができる。

【0004】そしてブローブアレイを用いた検出試験を行なう場合、一度の検出試験で検出することのできる生体高分子の種類数は、ブローブアレイに並べたブローブの種類数によって決定されるため、ブローブアレイに並べるブローブの種類は多い方が好ましい。また検出試験を行なうときには、ブローブアレイ全面にサンプルを行き渡らせることが必要であるため、ブローブアレイは小面積であることが好ましい。したがって、ブローブアレイに関する前述したような利点を追求する場合、ブローブアレイには、多種類のブローブが、小面積の領域に、高密度に集積されて並べられていることが好ましい。1平方センチメートルあたり100種類程度の集積密度でブローブが並べられていれば、ブローブアレイの前述した利点を発揮することができるが、これにとどまらず、ブローブ集積密度は高い方が好ましい。

【0005】また、一本鎖核酸の中の特定の塩基配列部分に対して特異的に結合するブローブのブローブアレイを用いて、サンプル中に含まれる核酸の塩基配列を決定する方法が提案されているが、この場合もブローブアレイのブローブ集積密度は高い方が好ましい。

【0006】しかしながらブローブ集積密度を高めると、それぞれの標的生体高分子に対する検出感度が低下するという不具合が発生する。これは、ブローブ集積密度を高めると、一種類のブローブが占有する領域（以下ではこの領域のことをスポットと呼称する）が小さくなり、スポットに含まれるブローブの絶対量（言い換えれば、ブローブ分子の絶対数）が減少することに起因する。一般的にブローブアレイは、ブローブ分子と標的生体高分子との結合によってもたらされる何らかのシグナルを検出することによって標的生体高分子の存在を認知する。このため、スポット中に含まれるブローブ分子の絶対数が減少すると、ブローブ分子と標的生体高分子の結合の絶対数が減少し、結果としてこの結合の発するシグナルが減少するため、検出感度が低下することになる。

【0007】例えば、蛍光標識した標的生体高分子がどのスポットに結合しているのかを、各スポットの蛍光量を測定することによって検出するような検出方式を考える。この場合、スポットに含まれるプローブ分子の絶対数が減少すれば、それに結合する蛍光標識された標的生体高分子の絶対数も減少し、その結果、シグナルとなる蛍光量が減少して感度が低下する。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プレート上の小さな領域の中に大量のプローブ分子を保持できるプローブアレイ用固相基材を提供して、高いプローブ集積密度と高い検出感度を両立するプローブアレイを提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明によるプローブアレイ用固相基材は、プレートを備えた固相基材であって、該プレートに該プレートの厚み方向に深さを持つ縦溝が設けられているプローブアレイ用固相基材である。ここで該縦溝は該プレートに形成した掘りこみであってもよいし、該プレートの表面上に形成した構造物の側面によって形成した空間であってもよいが、そのいずれであったとしても、該縦溝は次の3つの条件(1)～

(3)を満たすものとする。すなわち、(1)該縦溝は該プレートの表面に対してほぼ垂直な壁面によって形成された空間であり、(2)該縦溝の幅は100マイクロメートル以下であり、(3)該縦溝の深さは該縦溝の幅の2倍以上である。一つ補足すると、縦溝が該プレートに形成された掘りこみである場合、該縦溝は該プレートを貫通していてもよい。以下においては、本発明のこのプローブアレイ用固相基材を「縦溝配列固相基材」と呼称する。

【0010】本発明によるプローブアレイは、プローブアレイ用固相基材として縦溝配列固相基材を用いて、該縦溝配列固相基材の縦溝をスポットとしていて、該縦溝の壁面にプローブを保持しているプローブアレイである。

【0011】

【発明の実施の形態】(縦溝配列固相基材の形状例)図1～4に縦溝配列固相基材の形状の例を示す。ただし図1～4に示したのはあくまで例であって、本発明の縦溝配列固相基材の形状を限定するものではない。図1～3の例では、縦溝2はプレート1に設けられた掘りこみであって、図1、2の例では縦溝2がプレート1を貫通している。図4の例では、プレート1の表面上に形成した構造物4の壁面3によって縦溝2を形成している。そして図1～4に示したいずれの例においても、以下の3つの条件が満たされているものとする。すなわち、(1)縦溝2の壁面3はプレート1の表面に対してほぼ垂直であり、(2)縦溝2の幅(図1～4においてWで示した寸法)は100マイクロメートル以下であり、(3)縦

溝2の深さ(図1～4においてHで示した寸法)は縦溝2の幅Wの2倍以上である。

【0012】(縦溝配列固相基材の製造方法概略)これより、縦溝配列固相基材の製造方法をいくつか示す。ただし、以下に示すのは製造方法の例であって、本発明の縦溝配列固相基材の製造方法を限定するものではない。

【0013】図1～3に示した縦溝配列固相基材の例においては、プレート1に縦溝2が掘り込まれているが、このような縦溝配列固相基材を製造する方法の例を図6に示す。まず最初にプレート1の上にフォトリソグラフィにより形成する(図6a)。次に、このフォトリソグラフィのパターン10をマスクとして、プレート1をプラズマエッチングする(図6b)。ここで、プラズマエッチングとはイオンミリングやRIE(Reactive Ion Etching)などを指すものとする。プラズマエッチングの終了後、フォトリソグラフィのパターン10を除去することにより縦溝配列固相基材が完成する(図6c)。

【0014】縦溝配列固相基材を製造する際に課題となるのは、縦溝の壁面をプレートの表面に対してほぼ垂直にしなければならないという点と、縦溝の深さを縦溝の幅の2倍以上にしなければならないという点である。図6に示した製造方法の例では、この2つの課題をプラズマエッチングという垂直加工性に優れた加工技術を用いることによって解決した。

【0015】図6に示した製造方法とは別の製造方法を図7に示す。図7の製造方法においては、シリコン単結晶の異方性ウェットエッチングという技術を用いる。シリコン単結晶は水酸化カリウム水溶液等のアルカリ水溶液によってエッチングされるが、そのエッチング速度は結晶方位によって異なる。特に(111)結晶面は、その他の結晶方位面と比較してエッチング速度が極端に遅い。そのため、シリコン単結晶をアルカリ水溶液でエッチングすることによって掘りこみ加工するさいに、掘りこみの壁面が(111)結晶面となるようにパターンを決めておくと、掘りこみの開口幅に対する掘りこみ深さの比(以下、アスペクト比と呼称する)の大きな加工が可能である上、掘りこみの壁面もほぼ完全な平面となる。このことを利用したシリコン単結晶のエッチング加工技術が異方性ウェットエッチング技術であり、アスペクト比が10以上の加工が可能である。図7の製造方法では、この異方性ウェットエッチングを使用する。まず、プレート1としてシリコン単結晶のプレートを用意する。ここでプレート1の表面は(110)結晶面となるようにしておく。このプレート1の両面に窒化ケイ素膜20をCVD(Chemical Vapor Deposition)によって数百ナノメートル程度の厚みで成膜する(図7a)。つづいて、プレート1の片面の窒化ケイ素膜20をパターンニングする(図7b)。窒化ケイ素膜20をパターンニングする方法としては、

例えばフォトリソグラフィによって形成したフォトレジストのパターンをマスクとしたRIE (Reactive Ion Etching) などの方法が挙げられる。つづいて、パターンニングされた窒化ケイ素膜20をマスクにして、プレート1のシリコン単結晶を強アルカリ水溶液によってエッチングする(図7c)。そして最後に窒化ケイ素膜20を加熱した磷酸等で除去すれば、**10** 縦溝配列型固相基材が完成する(図7d)。ただし図7の方法を用いる場合には、縦溝2の設計形状を工夫することによって、壁面3が全て(111)結晶面になるようにしておく必要がある。プレート1の表面を(110)結晶面にしておけば、縦溝2の壁面3がすべて(111)結晶面になるように設計することが可能である。

【0016】図4に示した縦溝配列固相基材の例においては、プレート1の上に形成された構造物4の壁面3によって縦溝2が形成されている。このような縦溝配列固相基材の製造方法の例を図8に示す。まず最初にプレート1を用意して、その表面に金属の薄膜30を成膜する(図8a)。成膜の方法としては、例えば真空蒸着法やスパッタ成膜法が挙げられる。次にフォトレジストからなるパターン31を、薄膜30の上にフォトリソグラフィによって形成する(図8b)。続いて薄膜30を給電膜として電解メッキを行なうことにより、フォトレジストのパターン31が存在しない領域(すなわち薄膜30が露出している領域)に金属4を堆積(析出)させる(図8c)。続いて、フォトレジストのパターン31を除去すれば、縦溝配列固相基材が完成する(図8d)。図8の製造方法を用いた場合、縦溝2の形状はフォトレジストのパターン31の形状によって決定される。すなわち、フォトレジストのパターン31として、壁面がプレート1に対してほぼ垂直な、幅が100マイクロメートル以下の、アスペクト比が2以上であるパターンを形成すれば、それを鋳型として縦溝2を形成することができる。そして、このようなパターンを形成することのできるフォトレジストは、フォトレジストメーカーから市販されている。このようなフォトレジストの例としては、SU-8 (MicroChem Corp. 製)などを挙げることができる。またさらに、X線によってリソグラフィを行なうX線レジストにおいては、アスペクト比が100以上のパターンを形成できるレジストが**40** 知られているが、図8の製造方法の中でフォトレジストの代わりにこのようなX線レジストを使用し、フォトリソグラフィの代わりにX線リソグラフィを行なえば、よりアスペクト比の大きな縦溝を形成することができる。

【0017】図8に示した製造方法と類似の方法として、図8cにおいて電解メッキで行なっている金属4の堆積工程を、真空蒸着法やスパッタ成膜法で行なう方法を挙げることができる。この場合、フォトレジストのパターン31の上にも金属4が堆積するが、フォトレジス

トのパターン31を除去する工程において、その部分の金属4は剥離してしまう。

【0018】図4に示したような縦溝配列固相基材を製造する方法として、プレート1の上に形成したフォトレジストのパターンを、そのまま構造物4として使用する方法もありうる。

【0019】(縦溝配列固相基材にプローブ分子を保持させてプローブアレイを製造する方法の概略) 本発明のプローブアレイは固相基材として縦溝配列固相基材を用いていて、該縦溝配列固相基材の縦溝をスポットとしていて、該縦溝の壁面にプローブ分子を保持しているプローブアレイである。縦溝配列固相基材の各縦溝の壁面にプローブ分子を保持させてプローブアレイを作製する方法について、その概略を示す。ただし、以下に示す方法はあくまでも例であって、本発明のプローブアレイの製造方法を限定するものではない。

【0020】まず最初に、マイクロピペットやインクジェットノズルを用いて、縦溝配列固相基材の各縦溝、にプローブ分子の含まれる液滴を供給する。供給した液滴は、毛細管現象によって縦溝の内部へと吸引される。つづいて、縦溝の壁面に、液滴中のプローブ分子を化学的に結合させる。この方法としては、シランカプラー等の架橋剤を介して縦溝の壁面とプローブ分子とを共有結合させる方法や、金や銀やニッケルからなる縦溝の壁面とプローブ分子の硫黄原子とを配位結合させる方法などを挙げることができる。

【0021】(縦溝配列固相基材の縦溝の形状についての補足) 本発明のプローブアレイを製造する方法の中には、縦溝配列固相基材の各縦溝に、縦溝ごとに異なった組成の液滴を供給する工程を含むような方法がある(前記した製造方法もその一例である)。その場合、縦溝に供給した液滴が、毛細管現象によってスムーズに縦溝の内部へと吸引されることが好ましい。しかしながら縦溝の形状によっては、縦溝の中に気泡が入ってしまって、供給した液滴が縦溝の中へスムーズに入っていくことがないことがある。例えば縦溝が細長い垂直な穴であって、かつプレートが貫通していない場合などには、縦溝に液滴を供給したときに気泡が入って、供給した液滴が縦溝の中へスムーズに入っていくことがない。このような問題を回避するために、縦溝には気泡を逃がすための経路が存在することが好ましい。図1~4に示した縦溝配列固相基材の例では、いずれも気泡を逃がすための経路が縦溝に存在する。図1、2の例では縦溝がプレートが貫通しているため、プレートの表面側から縦溝に液滴を供給すると、縦溝の中の気泡はプレートの裏面側から抜けていく。図3、4に示した例では縦溝の脇腹が開放されているため、ここから気泡が抜ける。

【0022】

【作用】縦溝配列固相基材においては、一つの縦溝がプレートの表面上に占める占有面積を小さくした場合で

も、その縦溝の壁面の表面積を大きくしておくことが可能である。そのため、縦溝配列固相基材の縦溝をスポットとして用いて、縦溝の壁面にプローブを保持させれば、縦溝配列固相基材は小さな（プレートの表面における占有面積の小さな）スポットの中に大量のプローブ分子を保持することができる。

【0023】本発明によるプローブアレイは、固相基材として縦溝配列固相基材を用いて、該縦溝配列固相基材の縦溝をスポットとしていて、該縦溝の壁面にプローブを保持しているプローブアレイである。このプローブアレイにおいては、小さなスポットの中に大量のプローブ分子を保持させておくことが可能であるため、高い

プローブ集積密度と高い検出感度が両立する。

【0024】また、本発明のプローブアレイを製造する過程においては、縦溝配列固相基材の各縦溝にそれぞれ組成の異なる液滴を供給するという工程が含まれることがあるが、このとき供給した液滴が毛細管現象によって縦溝の内部へと吸引されて濡れ広がらないため、隣接する縦溝との間でクロスコンタミネーションを起こす危険が少ない。

【0025】

【実施例】（実施例1）縦溝配列固相基材の例（実施例1）を図9に示す。斜視図（一部断面図）を図9aに示し、図9a中において矢印bが示す部分の拡大図を図9bに示す。図9に示した通り、この縦溝配列固相基材は上層1と中間層51と下層50の3層構造になっている。上層1と下層50とは単結晶シリコンで形成されていて、そこに掘りこみ加工が施されているが、掘り込みの壁面はいずれも（111）結晶面となっている。また、上層1に形成された掘りこみが縦溝2となっており、縦溝2の幅は10マイクロメートル、深さは100マイクロメートルである。

【0026】図9の縦溝配列固相基材について、その製造方法を図10を用いながら以下に示す。まず最初にSOI（silicon on insulator）基板を用意する（図10a）。ここで、SOI基板の構成は以下の通りである。下層50：単結晶シリコン、ウェハ面の結晶面方位（110）、厚み300マイクロメートル。中間層51：酸化ケイ素、厚み1マイクロメートル。上層1：単結晶シリコン、ウェハ面の結晶面方位（110）、厚み100マイクロメートル。このようなSOI基板は、単結晶シリコンウェハと表面に熱酸化膜を形成した単結晶シリコンウェハとを直接接合することによって作製できるし、また、SOI基板として市販されている。このSOI基板の表面に、CVD（Chemical Vapor Deposition）によって、厚み300ナノメートルの窒化ケイ素膜52、53を形成する。ここで、上層1の表面に形成された窒化ケイ素膜を52として、下層50の表面に形成された窒化ケイ素膜を53とする（図10b）。続いて窒化ケイ素

膜53の上に、フォトリソグラフィによって、フォトレジストパターン54を形成する（図10c）。ここでフォトレジストパターン54は、下層50の掘りこみパターンに対応したパターンである。それからフォトレジストパターン54をマスクとして、 CF_4 をエッチングガスとするRIE（Reactive Ion Etching）を行なうことにより、窒化ケイ素膜53をパターンニングする（図10d）。フォトレジストパターン54を硫酸と過酸化水素水の混合液によって除去した後、水酸化カリウムの水溶液によって下層50の単結晶シリコンを、200マイクロメートル程度の深さまで異方性エッチングする（図10e）。続いて、窒化ケイ素膜52の上に、フォトリソグラフィによってフォトレジストパターン55を形成する（図10f）。ここでフォトレジストパターン55は、上層1の掘りこみパターン（縦溝）に対応したパターンである。それからフォトレジストパターン55をマスクとして、 CF_4 をエッチングガスとするRIE（Reactive Ion Etching）を行なうことにより、窒化ケイ素膜52をパターンニングする（図10g）。フォトレジストパターン55を硫酸と過酸化水素水の混合液によって除去した後、水酸化カリウムの水溶液によって、上層1と下層50の単結晶シリコンを中間層51に到達するまで異方性エッチングする（図10h）。続いて、160℃に加熱した硝酸によって窒化ケイ素膜52と窒化ケイ素膜53とを除去し、さらにフッ化水素水溶液によって中間層51の酸化ケイ素をエッチングする（図10i）。以上の工程によって、図9に示した縦溝配列固相基材を製造できる。

【0027】（実施例2）一本鎖DNA分子は、相補的な塩基配列を持つ一本鎖DNAもしくは一本鎖RNA分子に対するプローブとして働く。したがって、様々な塩基配列を持つ一本鎖DNAを固相基材の上に並べて保持したものはプローブアレイとなる（特にDNAチップと呼称される）。そして、プローブとなる一本鎖DNA分子を、実施例1の縦溝配列固相基材の縦溝2の壁面3に保持したプローブアレイは、本発明の実施例（実施例2）となる。実施例2のプローブアレイを作製する方法について以下に説明する。

【0028】まず最初に、実施例1で作製した縦溝配列固相基材の表面にマレイミド基を担持させる。その方法は以下の通りである。実施例1で作製した縦溝配列固相基材を、1100℃の酸素と水蒸気の雰囲気中に1時間放置する（表面酸化処理）。次いでアミノ基を結合したシラン化合物（N-β-（アミノエチル）-γ-アミノプロピルトリメトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：KBM6603；信越化学工業（株）社製）の1wt%水溶液を室温下で2時間程度攪拌し、上記シラン化合物の分子内のメトキシ基を加水分解する。そしてこの溶液に、表面酸化処理の完了した先の縦溝配

列固相基材を20分間浸漬し(室温)、引き上げて、窒素ガスを吹き付けることにより乾燥させ、120℃のオーブン中で1時間ベークする(シランカップリング処理)。シランカップリング処理によって、縦溝配列固相基材の表面にアミノ基が担持される。次いで、N-マレイミドカプロイロキシスクシンイミド(N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide)(以下、EMCSと呼称する)を、ジメチルスルホキシド(DMSO)/エタノールの1:1溶液に最終濃度が0.3mg/mlとなるように溶解したEMCS溶液を用意する。シランカップリング処理を行なった先の縦溝配列固相基材をこのEMCS溶液に室温で2時間浸漬して、縦溝配列固相基材の表面に担持されているアミノ基とEMCS溶液のカルボキシル基とを反応させる。これにより、縦溝配列固相基材の表面にはEMCS由来のマレイミド基が担持されることになる。EMCS溶液から引き上げたガラス板はDMSOとエタノールの混合溶媒及びエタノールで順次洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させる。

【0029】表面にマレイミド基を担持させた縦溝配列固相基材の各縦溝に、プローブとなる一本鎖DNA分子を保持させる方法を以下に示す。5'末端にチオール基を導入した一本鎖DNA(プローブ)を用意して、これを濃度が約400mg/mlになるようにTE溶液(10mM Tris-HCl(pH8)/1mM EDTA水溶液)に溶解し、一本鎖DNA溶液を調整する。ここで5'末端にチオール基を導入した一本鎖DNAの調整方法は公知である。表面にマレイミド基を担持させた縦溝配列固相基材の各縦溝に、調整した一本鎖DNA溶液を約20p1づつマイクロピペットで供給する。一本鎖DNA溶液の液滴を縦溝の開口部に接触させれば、毛細管現象によって、液滴は縦溝の内部へと吸引される。ただしこのとき大きな液滴の一部が隣接する縦溝にも接触し、吸引されてしまう危険があるため、一度に約20p1の液滴を供給するのではなく、3回程度に小分けして液滴を供給することによりこの危険を回避する。一本鎖DNA溶液の供給が完了した縦溝配列固相基材を、30分間加湿チャンバー内に静置して、縦溝配列固相基材表面のマレイミド基と一本鎖DNA 5'末端のチオール基とを反応させる。以上の処理が完了した縦溝配列固相基材を、1M NaCl/50mMリン酸緩衝液(pH7.0)溶液で洗浄して、未反応のDNAを含む液体を完全に洗い流す。次いで、この縦溝配列固相基材を2%ウシ血清アルブミン水溶液中に2時間浸漬して、縦溝配列固相基材表面上の未反応のマレイミド基をウシ血清アルブミンによってブロッキングする。以上の工程によって、縦溝配列固相基材の各縦溝の壁面にプローブとなる一本鎖DNAが保持されたプローブアレイ(DNAチップ)が完成する。

【0030】以上のように作製されたプローブアレイ

は、一般のプローブアレイと同じように使用できる。例えば、蛍光標識した標的DNAの存在を、縦溝の発する蛍光によって検出することができる。

【0031】(実施例3)縦溝配列固相基材の実施例1とは異なる例(実施例3)を図11に示す。斜視図(一部断面図)を図11aに示し、図11a中において矢印bが示す部分の拡大図を図11bに示す。図11に示した通り、ガラス基板1の上に、クロム薄膜60(厚み50ナノメートル)と、金薄膜61(厚み200ナノメートル)とが形成されていて、その上に金からなる構造物4が形成されている。そして、この構造物4の壁面3によって、縦溝2が形成されている。ここで、縦溝2の幅は30マイクロメートルで、深さは90マイクロメートルである。

【0032】図11の縦溝配列固相基材について、その製造方法を図12を用いながら以下に示す。まず最初に、厚み500マイクロメートルのガラス基板1を用意する(図12a)。そして、このガラス基板1の上に、厚み50ナノメートルのクロム薄膜60と厚み200ナノメートルの金薄膜61を真空蒸着法によって成膜する(図12b)。次に金薄膜61の上に、フォトリソグラフィによって、フォトレジストのパターン70を形成する(図12c)。ここでフォトレジストとしては、SU-8(MicroChem Corp. 製)を用いる。次いで、金薄膜61を給電膜として金の電解メッキを行ない、フォトレジストのパターン70を鋳型とするような、金からなる構造物4を形成する(図12d)。最後に、硫酸と過酸化水素水の混合液によってフォトレジストのパターン70を除去する(図12e)。以上の工程によって、図11に示した縦溝配列固相基材を製造できる。

【0033】(実施例4)一本鎖DNA分子は、相補的な塩基配列を持つ一本鎖DNAもしくは一本鎖RNA分子に対するプローブとして働く。したがって、様々な塩基配列を持つ一本鎖DNAを固相基材の上に並べて保持したものはプローブアレイとなる(特にDNAチップと呼称される)。そして、プローブとなる一本鎖DNA分子を、実施例3の縦溝配列固相基材の縦溝2の壁面3に保持したプローブアレイは、本発明の実施例(実施例4)となる。実施例4のプローブアレイを作製する方法について以下に説明する。

【0034】プローブとなる一本鎖DNAとして、5'末端にチオール基を導入した一本鎖DNAを用意する。そしてこの一本鎖DNAを、濃度が約400mg/mlになるようにTE溶液(10mM Tris-HCl(pH8)/1mM EDTA水溶液)に溶解し、一本鎖DNA溶液を調整する。ここで5'末端にチオール基を導入した一本鎖DNAの調整方法は公知である。次いで実施例3の縦溝配列固相基材の各縦溝に、調整した一本鎖DNA溶液を約200p1づつマイクロピペットで

供給する。一本鎖DNA溶液の液滴を縦溝2の開口部に接触させれば、毛細管現象によって、液滴は縦溝の内部へと吸引される。ただしこのとき大きな液滴の一部が隣接する縦溝にも接触し、吸引されてしまう危険があるため、一度に約200p1の液滴を供給するのではなく、10回程度に小分けして液滴を供給することによりこの危険を回避する。一本鎖DNA溶液の供給が完了した縦溝配列固相基材を、24時間加湿チャンパー内に静置して、縦溝配列固相基材表面の金原子と一本鎖DNA 5'末端のチオール基とを配位結合させる。以上の処理が完了した縦溝配列固相基材を、TE溶液で洗浄して、未反応のDNAを含む液体を完全に洗い流す。以上の工程によって、縦溝配列固相基材の各縦溝の壁面にプローブとなる一本鎖DNAが保持されたプローブアレイ（DNAチップ）が完成する。

【0035】以上のように作製されたプローブアレイは、一般のプローブアレイと同じように使用できる。例えば、蛍光標識した標的DNAの存在を、縦溝の発する蛍光によって検出することができる。

【0036】

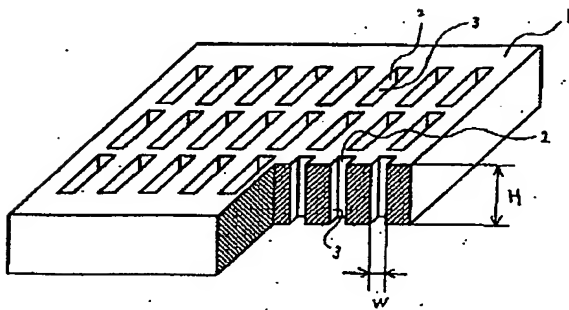
【発明の効果】以上説明したように、本発明の縦溝配列固相基材は小さな（プレート表面における占有面積の小さい）スポットの中に大量のプローブ分子を保持することができる。したがって、縦溝配列固相基材を用いた本発明のプローブアレイにおいては、高いプローブ集積密度と高い検出感度が両立する。

【0037】また、本発明のプローブアレイを製造する過程においては、縦溝配列固相基材の各縦溝にそれぞれ組成の異なる液滴を供給するという工程が含まれることがあるが、このとき供給した液滴が毛細管現象によって縦溝の内部へと吸引されて濡れ広がらないため、隣接する縦溝との間でクロスコンタミネーションを起こす危険が少ない。これも、本発明の縦溝配列固相基材が持つ長所の一つである。

【図面の簡単な説明】

【図1】縦溝配列固相基材（本発明）の一例についての*

【図1】



*斜視図（一部断面図）である。

【図2】縦溝配列固相基材（本発明）の図1とは異なる一例についての斜視図（一部断面図）である。

【図3】縦溝配列固相基材（本発明）の図1、2とは異なる一例についての斜視図（一部断面図）である。

【図4】縦溝配列固相基材（本発明）の図1～3とは異なる一例についての斜視図（一部断面図）である。

【図5】従来のプローブアレイの斜視図である。

【図6】図1～3に示したような縦溝配列固相基材を、製造するためのプロセスを示す概略断面図である。

【図7】図1～3に示したような縦溝配列固相基材を、製造するためのプロセス（図6に示したプロセスとは異なるプロセス）を示す概略断面図である。

【図8】図4に示したような縦溝配列固相基材を、製造するためのプロセスを示す概略断面図である。

【図9】（a）縦溝配列固相基材（本発明）の一例（実施例1）を示す斜視図（一部断面図）である。

（b）図9（a）の中の矢印bで指し示した付近の拡大図である。

【図10】図9に示した縦溝配列固相基材（実施例1）を、製造するためのプロセスを示す概略断面図である。

【図11】（a）縦溝配列固相基材（本発明）の一例（実施例3）を示す斜視図（一部断面図）である。

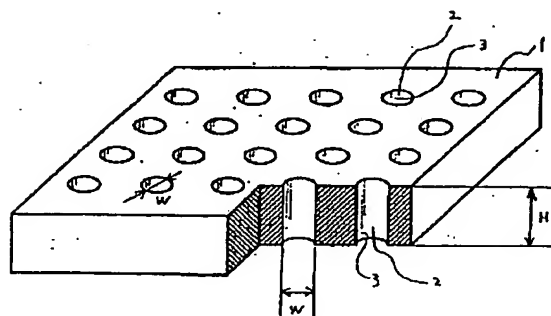
（b）図11（a）の中の矢印bで指し示した付近の拡大図である。

【図12】図11に示した縦溝配列固相基材（実施例3）を、製造するためのプロセスを示す概略断面図である。

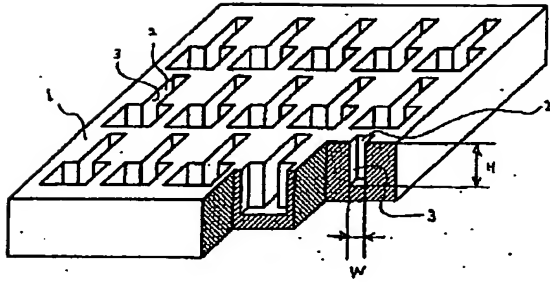
【符号の説明】

- 1 プレート
- 2 縦溝
- 3 縦溝の壁面
- 4 構造物
- 80 固相基材
- 81 プローブ

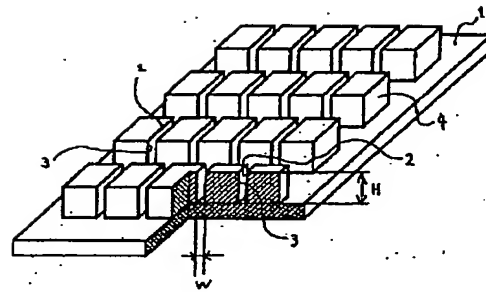
【図2】



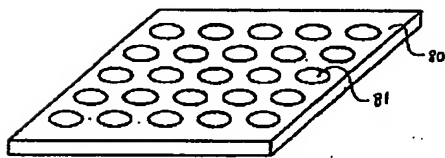
【図3】



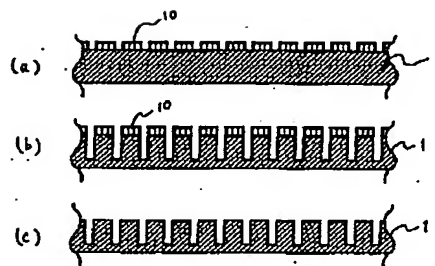
【図4】



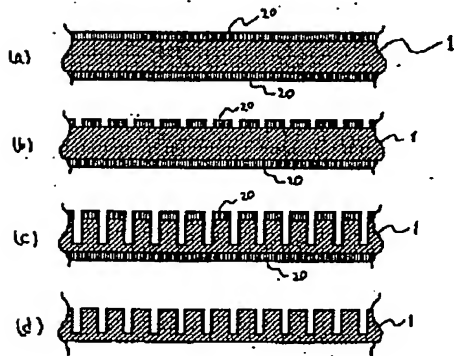
【図5】



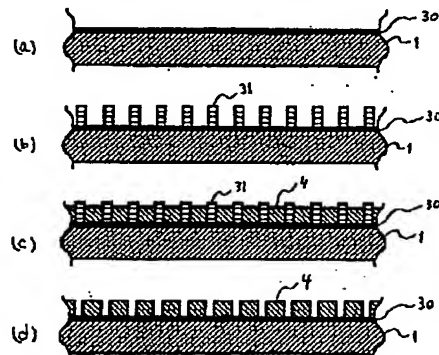
【図6】



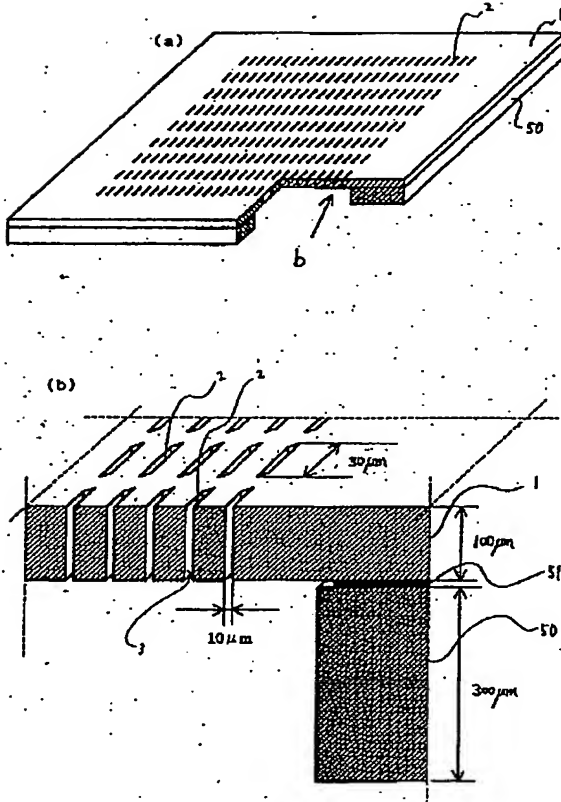
【図7】



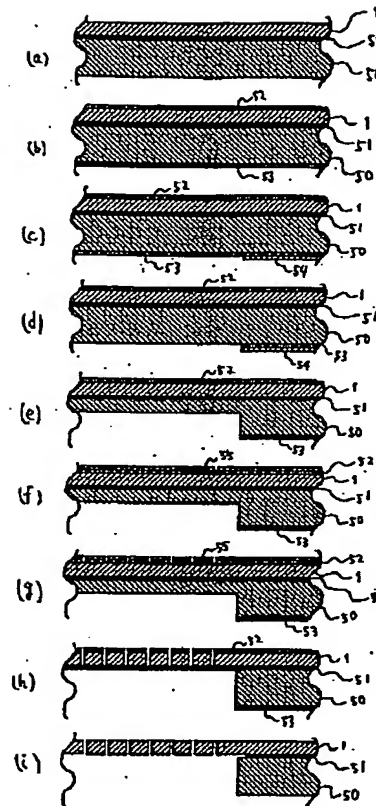
【図8】



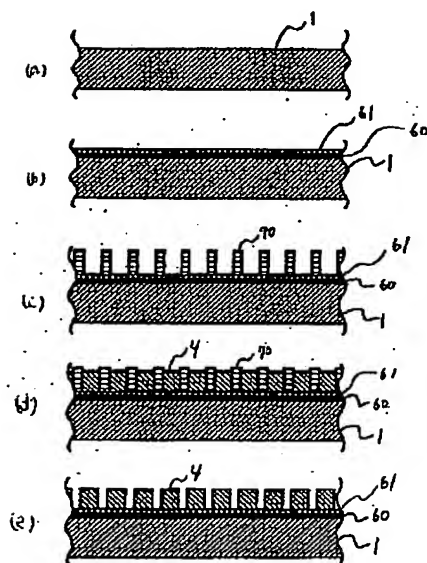
【図9】



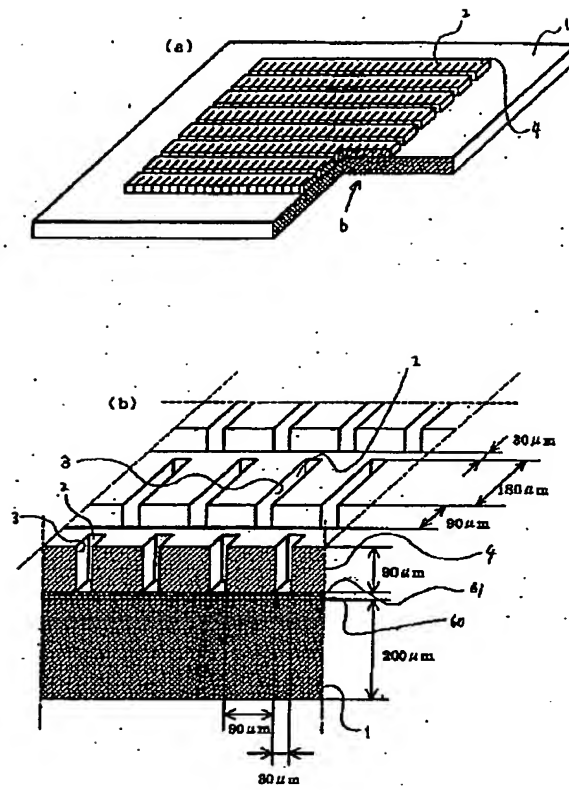
【図10】



【図12】



【図11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 35/02
37/00

識別記号

1 0 2

F I

G 0 1 N 37/00
C 1 2 N 15/00

キーワード(参考)

1 0 2
F